

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-247656

⑬ Int.Cl.⁴

G 01 N 31/00
33/52

識別記号

G A B

庁内整理番号

V-8506-2G
C-8305-2G

⑭ 公開 昭和63年(1988)10月14日

審査請求 有 請求項の数 13 (全6頁)

⑮ 発明の名称 チオール化合物を検出するのに有用な分析試薬、及びそれを用いた
検出方法

⑯ 特 願 昭63-21427

⑰ 出 願 昭63(1988)2月2日

優先権主張 ⑱ 1987年2月3日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P 37 03 081.7

| | | |
|---------|---------------------|---|
| ㉑ 発 明 者 | ホルガー・ハイデンラ イヒ | ドイツ連邦共和国、デイー - 2224 クーデン、ブランケネ ーゼ 18 |
| ㉒ 発 明 者 | ヘルベルト・ヒューグ ル | ドイツ連邦共和国、デイー - 5060 ベルギツシユ - グラ ドバツハ 2、ゲマルケンヴェーク 9 |
| ㉓ 発 明 者 | クラウス・ヴェーリン グ | ドイツ連邦共和国、5600 ヴツベルタル 1、パールケ・ シュトラッセ 5 |
| ㉔ 出 願 人 | マイルス・インコーポ レーテッド | アメリカ合衆国、インディアナ 46515、エルクハート、ミ ルトル・ストリート 1127 |
| ㉕ 代 理 人 | 弁理士 津 国 肇 | |

明 細 書

1. 発明の名称

チオール化合物を検出するのに有用な分析
試薬、及びそれを用いた検出方法

2. 特許請求の範囲

1. +3の酸化状態であり、少なくとも検出さ
るチオール化合物の量と等量の鉄、及び、

+2の酸化状態の鉄と選択的に錯体を形成
することができ、それによって該鉄との錯体形成
に基づく色変化を示すリガンドからなることを特
徴とする、液体試料中のチオール化合物、又はチ
オール化合物の存在に関連する物質を比色分析す
るための分析試験用試薬。

2. 該リガンドがフェロイン類、クプロイン
類、及びテロイン類からなる群の一である請求
項1記載の分析試験用試薬。

3. 該リガンドが錯体リガンド類、例えば、ヒ
ドラゾン類及びその互変異性アゾ体、テトラゾイ
ルピリジン類、ピリジルキナゾリン類、ビスーイ
ソキノリン類、イミン類、フェンナントロリン

類、ピピリジン類、ターピリジン類、ピジアジン
類、ピリジルジアジン類、ピリジルベンズイミダ
ゾール類、ジアジルトリアジン類、o-ニトロア
ニリン類、フェノール類、テトラジン類、トリア
ジン類、ピリジン類、フェナジン、キノキサリ
ン類、ベンズイミダゾール類、置換メチル又は
フェニル-2-ピリジルケトン類のオキシム類
からなる群の一である請求項2記載の分析試験
用試薬。

4. 更に疎水性基又はイオン交換官能基からな
る請求項1記載の分析試験用試薬。

5. 該疎水性基が長鎖アルキル基及びアラルキ
ル基からなる群のものである請求項4記載の分析
試験用試薬。

6. 更に吸収性担体マトリクスからなる請求
項5記載の分析試験用試薬。

7. +3の酸化状態の鉄からなり、かつ、+2
の酸化状態の鉄と選択的に錯体を形成することが
でき、それによって、+2の酸化状態のかかる鉄
イオンとの錯体形成により、色変化を起こすリガ

ンドからもなっている液と、液体試料を一緒にすることを特徴とする、液体試料中のチオール化合物、又はチオール化合物の存在に関連する物質の分析方法。

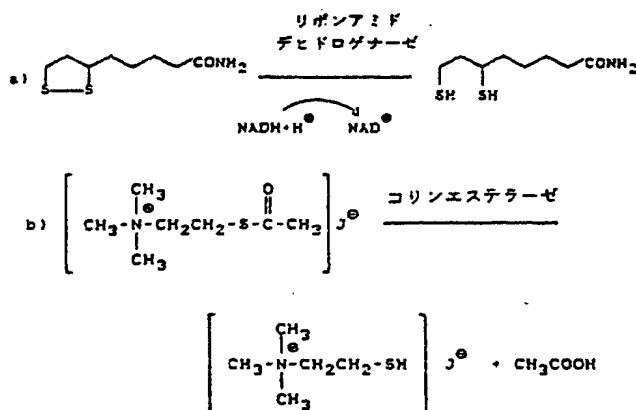
8. 検出されるチオが、リボン酸アミド (liponic acid amide)、チオコリン、グルタチオン及びチオグリコシド類からなる群の一である請求項7記載の方法。

9. 分析されるチオがチオエステル、チオエーテル、ジスルフィド又はチオアセタールの前駆物質の形態で存在する請求項7記載の方法。

10. チオ化合物を開裂する酵素が間接的に分析される請求項7記載の方法。

11. 該酵素がエステラーゼ類、チオグリコシダーゼ類又はチオエステラーゼ類からなる群の一である請求項10記載の方法。

12. リポアミド類及びリポアミドデヒドロゲナーゼ類を補助的に用いて、還元されたビリジンスクレオチド類を分析するために該方法を用いる請求項7記載の方法。



のようなジスルフィドの還元反応及び生化学的反應を挙げることができる。

数多くの方法がチオール基を含む化合物の検出に関して公知である。特に有用であり、しばしば引用される方法は、G. K. Ellmanによって Arch. Biochem. Biophys., 第82巻 70 ~ 77頁 (1958年) に記載されているものである。この方法は、3-メルカプト-6-ニトロ-安息香酸の黄色のアニオンを生成する3,3'-ジチオ-ビス-6-ニ

13. 基質の反応によって遊離チオール基が直接又は間接的に形成され、これらチオール基を、請求項1記載の試験用試薬を補助的に用いて検出する請求項7記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

発明の分野

本発明は、反応工程で一時的に発生するチオール化合物をはじめとする、液体系中のチオール化合物を測定するための分析試薬及び方法に関する。更に詳しくは、本発明の分析試薬及び方法は、チオール化合物の比色分析に関するものであり、チオール化合物の存在に関連したり、その原因となる試薬又は酵素の存在の測定に用いることができる。

発明の背景

チオール化合物は天然に存在し、また、化学反応によって製造することもできる。かかる反応としては、次式：

トロ安息香酸 (Ellman試薬) とのチオール反応に基づくものである。

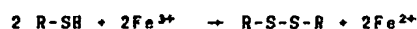
しかしながら、Ellman法の一つの欠点は、還元されたジスルフィド類によって黄色の色合いのみしか生じないという事である。赤色又は青色領域の色合いが出れば、通常、はるかに望ましいと考えられており、したがって、チオール類の視覚測定に、より適するであろう。

したがって、本発明の目的は、試薬及び方法によって与えられる色が赤又は青色の領域である、チオール化合物を比色分析するための、信頼性があり、正確で安価な分析試薬及び方法を提供することである。

本発明の他の目的は、本明細書及び請求項を読めば当業者に明らかになろう。

好ましい実施態様の詳細な説明

本発明の試薬及び方法は、次の反応式に関するものである。



この反応において、チオール化合物は+3の酸化状態の鉄と相互作用し、鉄イオンを+2の状態に還元せしめ、これによって、該チオール化合物を酸化せしめてジスルフィドを形成せしめる。得られる Fe^{2+} イオンは好適なリガンドと錯体を形成し、色変化を起こすことができる。本方法において Fe^{2+} のモル減少率(molar extinction)、及び発色リガンド： Fe^{2+} 錯体によって得られる色変化は、系中に最初に存在しているチオール化合物の量に直接関連する。

数多くの方法が、発色錯体として好適な錯体リガンドによる Fe^{2+} イオンの検出に関して公知である。この目的のために好適なリガンドの例としては、フェロイン類、クプロイン類及びテロイン類からなる群より選択される化合物が挙げられる。特に好適な錯体リガンドとしては、ヒドラゾン類及びその互変異性アゾ体、テトラゾイルピリジン類、ピリジルキナゾリン類、ビスーイソキノリン類、イミン類、フェナントロリン類、ビピリジン類、ターピリジン類、ピジアジン類、ピリジ

ルジアジン類、ピリジルベンズイミダゾール類、ジアジルトリアジン類、o-ニトロアニリン類、フェノール類、テトラジン類、トリアジン類、ピリジン類、フェナジン類、キノキサリン類、ベンズイミダゾール類、置換メチル又はフェニル-2-ピリジルケトン類のオキシム類が挙げられる[Smith, *Analyt. Chem.*, 28, 1534~1538 (1954年); Schiltら, *Talanta*, 15, 475~478 (1968年); Schiltら, *Talanta*, 15, 1055~1058 (1968年); 及び, Schiltら, *Talanta*, 16, 448~452 (1969年)]。他の錯体リガンドに関する記載は、BlandamerらのJ. Chem. Soc., Dalton 1001~1008 (1978年)、CaseのJ. Org. Chem., 31, 2398~2400 (1966年)に、また、英特許出願第701,843号において見られる。もちろん、ここに示したもの以外の錯体リガンドを用いることもできる。

試験片型材中に錯体リガンドを組み込んで本発明の実施態様を用いる場合は、疎水性基又はイオン交換官能基も有するようにすることが有利であ

る。これによって錯体リガンドのマトリクスへの結合が改善され、それによって試験片が「ブリード」するのが防止される。用いることができる疎水性基の例としては、長鎖のアルキル又はアラルキル基が挙げられる。錯体リガンドのポリマー結合も考えられる。

本発明によれば、該試験用試薬をリボン酸アミド(liponic acid amide)、チオコリン、グルタチオン又は補酵素Aのようなチオール類、あるいはチオグリコシド類のチオール類を検出するために用いることができる。更に、チオエステル、チオエーテル、ジスルフィド又はチオアセタールが試験系において生成する場合などにチオール前駆物質を検出することもできる。

本発明の試験用試薬は、チオエーテルヒドロラーゼ類、チオエステラーゼ類又はチオグリコシダーゼ類のようなチオ化合物を開裂する酵素を分析するのに好適である。更に、コリンエステラーゼ(CHE)のようなエステラーゼ類も検出することができる。CHEの通常の基質はアセチルコ

リンであるが、この酵素はアセチル-及びブチリルチオコリンを開裂することもでき、該試験用試薬は開裂によって生成する遊離チオール基を検出することができる。本発明はまた、還元されたニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)の存在下での、リボンアミドデヒドロゲナーゼ(liponamide dehydrogenase)を触媒として用いるリボン酸(liponic acid)の還元のような酸化還元反応によって遊離チオール基が生成する生化学的反応と共に用いることもできる。

したがって、本発明の試験用試薬は、NADHによる反応の分析に用いることができる。NADHによる酵素の典型例としては、ラクテートデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、グリセロールアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、マレートデヒドロゲナーゼなどが挙げられる。NADHはまた、グルタメートオキサルアセテートトランスアミナーゼ(EC 2.6.1.1)、グルタメートビルベートトラ

ンスアミナーゼ (EC 2.6.1.2) 又はクレアチニンキナーゼ (EC 2.7.3.2) の分析の場合のように、多段階酵素反応の最終生成物であってもよい。

NADHはまた、ラクテート、グルコース、マレート、尿素などのような基質の分析においては反応生成物であってもよい。NADHによる反応の分析において本発明の試験用試薬を用いることにより、NADH 1モルあたり2モルの Fe^{3+} が生成し、いくつかの場合の発色錯体が非常に高い吸光係数を有するので感度が実質的に向上する。

チオール基質に結合している Fe^{3+} 錯体を提供することが有利であることが証明され、可能な錯体形成用試薬は、EDTA、HEDTA、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、例えばアラニン、グリシン、及びグルタミンのようなアミノ酸類、例えば18-クラウン-6、フェニルアザ-15-クラウン-5、ベンゾ-15-クラウン-5及びジベンゾピリジノ-15-クラウン-5のようなクラ

は錠剤もしくは凍結乾燥物の形態で混合することができる。試薬配合物は既に溶液状態になってはいない場合は、水又は他の好適な溶液中に溶解することができ、試薬溶液はこれによって調製される。試薬配合物が個々の成分からなる場合は、これらを互いに混合する。試料（例えば基質溶液、酵素溶液、血清、血漿又は尿）を試薬配合物の一部と混合した後に、得られた色を光度計で測定する。次に、特定の濃度、又は基質濃度を、モル吸光係数及び加えた試薬又は試料の量から計算する。動的測定及び終点測定のいずれも可能である。

Fe^{3+} /リガンド系を、

1. 特定のパラメーター検出に必要な1以上の試薬又は他の酵素；
2. 緩衝系；
3. 凝調剤；
4. 活性化剤；及び、
5. 他の助剤

と共に吸収性試薬担持体（例えば紙、フリースな

ウンエーテル類、又はトリアジノファン類及びグリブテート類である。

チオール： Fe^{3+} の濃度比は少なくとも1：1でなければならず、好ましくは約1：5である。反応を最も速くするためには1：10の比も好ましいが、1：20の比が特に好ましい。

本発明に関する試験用試薬又は試験系を用いてセル中の分析対象物を測定することができる。 Fe^{3+} イオン及び錯体リガンドに加えて、該試験用試薬は、酵素、基質、補酵素、エフェクター、抗原、抗体などのような、特定の分析に必要なすべての試薬を含有することもできる。これらの試験用試薬は、緩衝剤、凝調剤及び安定化剤のような、反応しない物質を含有することができる。

上記記載のように、NADH及びNADPHを補酵素として用いてチオール基を生成する酵素、例えばリボンアミドデヒドロゲナーゼ及びグルタチオンレダクターゼを測定することができる。試薬配合物を酵素、試薬及び既に述べた物質から調製することができ、また、溶液又は粉末として又

ど）上に含浸せしめることもできる。これについては、試薬又は助剤がどの程度溶解するかによって、水溶液、有機溶液又は混合溶液の形態で1以上の含浸溶液を調製することができる。

吸収性又は膨潤性担持体、好ましくは濾紙、又はガラスもしくはプラスチックの吸収性フリースにこれらの溶液を含浸又は噴霧し、次に乾燥する。このようにして製造された試薬担持体を、液体試料、すなわち、血液、尿もしくは唾液のような体液、又は果汁、牛乳などのような食品の含有物を直接測定するための迅速診断薬として用いることもできる。それによって液体を試薬担持体に直接施すか、又は担持体を液体中に短時間浸漬する。比較用の色を、このようにして生成した色に対して配置することによって半定量的分析が可能である。定量的分析は反射光度計によって行なうことができる。

本発明による試験用試薬を、柱型成形用溶液から製造される担体マトリクス中に組み込むことも可能である。ここで示しうる例は、セルロース、

セルロース誘導体、ゼラチン、ゼラチン誘導体、又はポリウレタン及びアクリルアミドのようなプラスチックである。ここで、試験用試薬、及び、適当な場合には他の必要な試薬を注型成形用溶液に直接加えると有利である。それによって、一つの操作で担体及び試薬からなる試験具を製造することができる。

上記記載の試薬を、水又は緩衝剤又は血清によって吸収性担体から溶出せしめることによって試薬溶液を得ることができる。次に基質又は酵素を上記記載のように光度計のセル中で測定することができる。

記載された試験用試薬に好適な緩衝剤は、アルカリ金属又はアンモニウム対向イオンを有するリン酸塩、クエン酸塩、ホウ酸塩、及びGOOD緩衝剤である。しかしながら他の系を用いることもできる。pH 6.5~7.5が好ましいが、目的とするpH値は6~10である。

阻調剤は、本発明による化合物とイオン性相互作用を起こすアニオン及びカチオン阻調剤が特に

好ましい。酵素を活性化する非イオン阻調剤を用いることもでき、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム及びアルキルアリールポリエーテルアルコール類が好ましい。

用いることができるエフェクターは特定の酵素反応に関して公知のものである。

適当な他の助剤は、他の色原体を用いた対応する試験において公知のもののような、通常の増粘剤、可溶化剤、乳化剤、光学的増白剤、一定媒体などである。

実施例

FeCl₃及び錯体リガンドによるチオール分析

記載された試験系においてNADHを検出するために、次の試薬成分をセル中に入れた。

表 1

| NADH (ミリモル/ℓ) | E _{515 nm} |
|------------------|---------------------|
| 1 | 0.124 |
| 2 | 0.219 |
| 3 | 0.327 |
| 4 | 0.428 |
| 5 | 0.513 |
| 6 | 0.633 |
| 7 | 0.735 |
| 8 | 0.822 |
| 9 | 0.884 |
| 10 | 1.088 |

種々の錯体リガンドを用いて得られる色、及び対応する最大吸光度を表2に示した。

試験における濃度

| | | |
|---------------------------------|-----|--------|
| 0.1 N/ℓ 酢酸塩緩衝剤 1740 μℓ, pH=5 | 87 | ミリモル/ℓ |
| リボンアミド 100 μℓ | 2.5 | ミリモル/ℓ |
| FeCl ₃ 溶液 100 μℓ | 1 | ミリモル/ℓ |
| ジピリジル 80 μℓ | 3 | ミリモル/ℓ |
| リボンアミドデヒドロ ゲナーゼ 20 μℓ | 12 | kV/ℓ |

試薬ブランク値を測定後、NADH溶液20 μℓを加えることによって反応を開始させた。515 nmにおいて最大吸光度が測定された。動的測定によって、僅か1時間の反応時間後に安定な終了点(20分以内の吸光度変化が1%)が示された。

作用能力及び直線性を試験するために、1~10ミリモル/ℓの範囲のNADH濃度を回分試験で測定した。515 nmにおいて測定した吸光度の違いを表1に示した。

表 2

| | 構造式 | 色 | λ_{max} |
|---|-----|---|-----------------|
| 1 | | 赤 | 540 |
| 2 | | 青 | 615 |
| 3 | | 赤 | 508 |
| 4 | | 赤 | 510 |
| 5 | | 紫 | 556 |
| 6 | | 青 | 650 |

表 2 (続き)

| | 構造式 | 色 | λ_{max} |
|----|-----|---|-----------------|
| 7 | | 赤 | 522 |
| 8 | | 紫 | 552 |
| 8 | | 紫 | 560 |
| 10 | | 紫 | 583 |
| 11 | | 黄 | 441 |
| 12 | | 黄 | 443 |

手続補正書

昭和63年 4月18日

特許庁長官 小 川 邦 夫 殿

1. 事件の表示

昭和63年特許願第 21427号

2. 発明の名称

チオール化合物を検出するのに有用な分析試薬、及びそれを用いた検出方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 マイルス・インコーポレーテッド

4. 代理人

住 所 〒107 東京都港区赤坂2-10-8 第一信和ビル

氏 名 弁 理 士 (7866) 津 国 電話(586)1738~

5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正の対象 明細書の特許請求の範囲の欄

7. 補正の対象 別紙のとおり

特許請求の範囲

1. +3の酸化状態であり、少なくとも検出するチオール化合物の量と等量の鉄、及び、

+2の酸化状態の鉄と選択的に錯体を形成することができ、それによって該鉄との錯体形成に基づく色変化を示すリガンドからなることを特徴とする、液体試料中のチオール化合物、又はチオール化合物の存在に関連する物質を比色分析するための分析試験用試薬。

2. +3の酸化状態の鉄からなり、かつ、+2の酸化状態の鉄と選択的に錯体を形成することができ、それによって、+2の酸化状態のかかる鉄イオンとの錯体形成により、色変化を起こすリガンドからなっている液と、液体試料を一括にすることを特徴とする、液体試料中のチオール化合物、又はチオール化合物の存在に関連する物質の分析方法。